

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Avaliação dos impactos ambientais da
aquicultura em tanques rede sobre a
comunidade fitoplanctônica por análise de
pigmentos**

Lisângela Coracini Caceris

Jaboticabal, SP
2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Avaliação dos impactos ambientais da
aquicultura em tanques rede sobre a
comunidade fitoplanctônica por análise de
pigmentos**

Lisângela Coracini Caceris

Orientador: Dr. Gianmarco Silva David

Dissertação, apresentada ao programa de Pós- Graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP - CAUNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Jaboticabal, SP
2018

Caceris, Lisângela Coracini
C118a Avaliação dos impactos ambientais da aquicultura em tanques rede
sobre a comunidade fitoplanctônica por análise de pigmentos /
Lisângela Coracini Caceris. -- Jaboticabal, 2018
iv, 43 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de
Aquicultura, 2018

Orientadora: Gianmarco Silva David

Banca examinadora: Jozrael Henriques Rezende, Maria Fernanda
Falcone Dias

Bibliografia

1. Fitoplâncton. 2. Florações. 3. Toxinas. 4. Impactos. I. Título. II.
Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.3

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Unidade Complementar - Jaboticabal

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

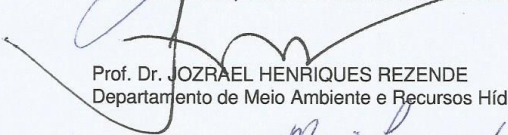
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Avaliação dos impactos ambientais sobre a comunidade fitoplanctônica partir da análise de pigmentos."

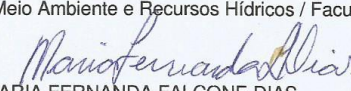
AUTORA: LISANGELA CORACINI CACERIS

ORIENTADOR: GIANMARCO SILVA DAVID

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em AQUICULTURA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. GIANMARCO SILVA DAVID
Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Jaú / Agência Paulista de Tecnologia do Agronegócio


Prof. Dr. JOZRAEL HENRIQUES REZENDE
Departamento de Meio Ambiente e Recursos Hídricos / Faculdade de Tecnologia de Jahu


Pós-Doutoranda MARIA FERNANDA FALCONE DIAS
. / APTA, Jaú-SP

Jaboticabal, 20 de junho de 2018

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Martin Luther King)

Dedicatória

À Deus por mais uma conquista alcançada!

À Nossa senhora Aparecida e Santa Catarina de Alexandria, por ouvir minhas preces!

Ao meu filho amado Rafael Coracini Caceris.

Ao meu esposo Diego Pereira Caceris, pelo companheirismo, amor, compreensão, apoio e torcida.

Aos meus pais Leonildo Coracini e Josefa Candido de Miranda Coracini por todo carinho, amor, apoio e incentivo.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Gianmarco Silva David, pela orientação, ensinamentos e confiança depositados á mim.

A Prof^a Dra Evelize de Fátima Saraiva David, pelo apoio e incentivo cedendo o laboratório das Faculdades Integradas de Bauru (FIB).

A todos meus Familiares por ajudar e cuidar de meu filho enquanto estava fora.

As minhas amigas de laboratório da APTA de Jau, por me apoiar e ensinar diariamente.

Ao pessoal do Laboratório das Faculdades Integradas de Bauru, pelo auxilio e paciência depositado a mim.

A Andréa Tutti e Andréa Dias, do Instituto de Botânica, por me ajudar na identificação das Cianobactérias.

Ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP), pela oportunidade.

A todos os funcionários do CAUNESP.

A CNPq pela bolsa de mestrado, processo nº 131561/2017-0.

A todos que estiveram me apoiando e me ajudando seja de forma direta ou indiretamente.

SUMÁRIO

Agradecimentos	i
Lista de figuras.....	iv
Lista de tabelas	v
Resumo.....	1
Abstract.....	2
Capítulo 1.....	3
1.0 Introdução geral	3
1.1 Fitoplâncton	3
1.2 Cianobactérias	4
1.3 Pigmentos	8
1.4 Aquicultura em tanques redes	10
2. Objetivo geral	12
2.1 Objetivos específicos	12
3. Material e métodos.....	13
3.1 Locais de coleta	13
3.2 Cultivo de Cianobactérias	15
Referências.....	20
Capítulo 2.....	26
Resumo.....	27
Abstract.....	28
1. Introdução	29
2. Material e Métodos.....	30
2.1 Análises de pigmentos por CLAE	31
2.2 Cultivo de Cianobactérias:	32
2.3 Medições Limnológicas e Fluorométricas <i>in situ</i>	32
2.4 Análise Estatísticas	33
3. Resultados	33
3.1 Pigmentos por CLAE	33
3.2 Cultivo de cianobactérias.....	34
3.3 Medições limnológicas e fluorométricas <i>in situ</i>	34
4. Discussão.....	37
Análises de pigmentos.....	37
Medições limnológicas e fluorométricas	38

5. Conclusões	39
Referências	40

Lista de figuras

Capítulo 1

Figura 1: Aspecto típico de floração de cianobactérias, com formação de nata ou espuma verde intensa sobre a superfície da água.....8

Figura 2: Mapa dos reservatórios avaliados durante o presente estudo.....14

Figura 3: Exemplos da disposição das estruturas de cultivo nas diferentes fazendas analisadas neste estudo.14

Figura 4: Sequencia das etapas do cultivo de cianobactérias: (a) inoculação da amostra de água em meio nutritivo líquido, (b) placas de Petri com amostras em meio sólido e tubos de ensaio com amostras em meio líquido, (c) identificação em microscópio da espécie *Chroococcus* cf, (d) etapa de purificação das cepas.19

Capítulo 2

Figura 2: Mapa dos reservatórios avaliados durante o presente estudo.....30

Lista de tabelas

Capítulo 1

Tabela 1: Distribuição dos pigmentos mais comuns nos diferentes grupos de organismos do fitoplâncton.	9
Tabela 2: Identificação e localização das pisciculturas estudadas neste projeto. .	13
Tabela 3: Pontos efetivamente amostrados no presente estudo.	15
Tabela 4: Composição e quantidade das soluções estoques para o preparo do meio de cultura concentrado.	17
Tabela 5: Composição de metais traços (*).	17

Capítulo 2

Tabela 1: Quantificação dos pigmentos encontrados nas seis pisciculturas estudadas.....	32
Tabela 2: Quantificação dos pigmentos encontrados nas culturas puras.....	33
Tabela 3: Dados ambientais encontrados nas seis pisciculturas estudadas. Ambientais foram: Temperatura; condutividade; oxigênio dissolvido; TDS; PH e turbidez.....	34
Tabela 4: Dados taxonômicos.....	35
Tabela 5: Dados ambientais das amostras cultivadas em laboratório.....	36

Resumo

A qualidade da água no sistema tanques redes é o fator mais importante e deve se ter manejos adequados para que não haja problemas com a produção e nem com o ambiente. O surgimento de cianobactérias devido ao excesso de nutriente existentes nestas áreas é um dos fatores mais preocupantes para o setor, algumas espécies podem emitir toxinas causando danos não apenas para os animais, mais também para o ambiente e demais usos da água. O presente estudo teve como objetivo avaliar os impactos causados pelas pisciculturas em tanques redes sobre a comunidade fitoplanctonica. O trabalho foi realizado em dois laboratórios, o cultivo e purificação de cepas puras de cianobactérias foram realizados no laboratório das Faculdades Integradas de Bauru (FIB), as amostras de pigmentos e os dados das culturas puras foram analisados em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) no laboratório da APTA de Jaú. As amostras de pigmentos foram coletadas em seis pisciculturas em localizações diferentes, em três pontos determinados nos cultivos de tilápias, à montante e à jusante, onde foram também coletadas as amostras das análises taxonômicas e os dados ambientais. Os resultados mostraram presença de cianobactérias através de pigmento equinenona em todas as amostras coletadas, esses dados se repetem nas análises taxonômicas e ambientais. Através dos resultados obtidos foi concluído que não foi detectado um padrão de aumento da concentração de pigmentos e dos diferentes grupos fitoplanctônicos no interior das fazendas, assim como não houve deterioração da qualidade da água quando comparados os pontos à montante e à jusante, e as condições limnológicas entre as diferentes bacias estudadas foram significativamente diferentes, indicando graus diferentes de susceptibilidade entre as áreas de cultivo.

Palavras-chave: fitoplâncton, florações, toxinas, impactos.

Abstract

Water quality is a main issue in cage Aquaculture, and proper management is needed to avoid environmental problems that affects negatively production. The emergence of cyanobacteria due to excess nutrients in these areas is one of the most worrisome factors for the sector, some species can emit toxins causing damage not only to animals, but also to the environment and other uses of water. The present study aimed to evaluate the impacts caused by cage farms on the phytoplankton community. The work was carried out in two laboratories, the cultivation and purification of pure strains of cyanobacteria were carried out in the laboratory of Faculdades Integradas de Bauru (FIB), the pigment samples and the data of the pure cultures were analyzed in High Performance Liquid Chromatography (HPLC) at APTA laboratory in Jaú. The pigment samples were collected in six fish farms at different locations, at three points determined in tilapia farms, upstream and downstream, where taxonomic analyzes and environmental data were also collected. The results showed the presence of cyanobacteria through pigment equinenone in all samples collected. No pattern of increase in the concentration of pigments or the different phytoplankton groups inside the farms was detected, nor was there any deterioration of the water quality when the upstream and downstream points were compared, and the limnological conditions between the different basins studied were significantly different, indicating degrees of susceptibility between farming areas.

Key-words: phytoplankton, blooms, toxins, impacts.

Capítulo 1

1.0 Introdução geral

1.1 Fitoplâncton

O fitoplâncton tem sua definição como um conjunto de organismos que vivem à deriva na coluna d'água e fazem fotossíntese, incluindo os grupos taxonômicos de algas e cianobactérias (ESTEVES, 2011). Juntamente com as algas perifíticas e macrófitas aquáticas, realizam fotossíntese e participam da fase biológica de ciclagem dos nutrientes nos ambientes aquáticos. Diversos são os grupos de algas encontrados em águas salgadas e doces, mais a diversidade em águas lacustres é bem maior do que em ambiente marinho (HUPPERT *et al.*, 2004).

Ao longo do ano há variações da densidade e composição específica das comunidades fitoplanctônicas, mais evidentes em lagos de regiões temperadas do que em lagos de regiões tropicais segundo (WETZEL, 1993). A radiação solar é utilizada como fonte de energia para o fitoplâncton, sendo a variação temporal e espacial da disponibilidade luminosa importante fator que regula sua produtividade. Além da radiação, o fitoplâncton necessita de nutrientes para seu desenvolvimento, especialmente o fósforo e o nitrogênio que são demandados em maior quantidade, participando na formação de proteínas, ácidos nucleicos e outros compostos indispensáveis para sua reprodução e sobrevivência. O nitrogênio e o fósforo são obtidos diretamente da água pelo fitoplâncton e repassados para outros compartimentos tróficos do ecossistema. A temperatura também influencia na taxa de crescimento, podendo atuar de duas maneiras, diretamente sobre o fitoplâncton ou indiretamente alterando a distribuição de nutrientes na zona eutrófica. Dentre os grupos mais abundantes do fitoplâncton de água doce podemos destacar Euglenophyta, Chlorophyta, Charophyta, Heterokontas e Cyanophyta, estes últimos também conhecidos como cianobactérias (ESTEVES, 2011).

Quando expostas em condições favoráveis, muitas espécies crescem em altas densidades, em um fenômeno conhecido como floração de algas. Geralmente isto ocorre em épocas quentes e em áreas com grandes

concentrações de nutrientes (ESTEVES, 2011). Uma descrição mais específica das florações de algas seria o desenvolvimento acelerado de microrganismos de uma ou mais espécies, de curta duração com mudanças visíveis na coloração da água, diretamente correlacionada com a eutrofização das águas. Dentre os problemas causados pela eutrofização são destacados a diminuição do desenvolvimento de plantas aquáticas profundas, redução da diversidade biológica e liberação de toxinas por algumas espécies de *cyanophyta*, podendo ocasionar a morte de organismos aquáticos. Em determinados casos quando consumidos em níveis tóxicos por animais ou humanos, podem causar danos à saúde através de intoxicação (CARMICHAEL, 1994).

O fitoplâncton, assim como os demais organismos presentes na água, está sujeito às variações em sua comunidade ocasionadas por estas mudanças no ambiente. Em relação aos grupos de fitoplâncton que tem recebido grande atenção atualmente estão as cianobactérias, devido aos frequentes episódios de florações.

1.2 Cianobactérias

Cianobactérias são também conhecidas por algas azuis, seu nome teve origem a partir de um dos seus principais pigmentos, a ficocianina (ESTEVES, 2011). As cianobactérias possuem potencial de produção de toxinas, entre elas as anatoxinas, cilindrospermopsinas e microcistinas, associadas às ocorrências de florações. Seu aparecimento no corpo d'água engloba diversos fatores ambientais, tais como a eutrofização por excesso de nutrientes como fósforo e nitrogênio, em conjunto com altas temperaturas e baixa hidrodinâmica favorecem o desenvolvimento destes microrganismos (CARMICHAEL, 1994).

Suas florações podem causar diversos danos ao ambiente aquático, sendo que a cada espécie tem suas características; o efeito mais comum é a mudança de turbidez e coloração da água.

Cianobactérias são organismos fotoautótrofos, procarióticos e aeróbios que habitam ambientes marinhos, terrestres, salobros e dulcícolas, podem estar presentes sobre macrófitas, na coluna d'água e nos sedimentos. São capazes de fixar nitrogênio atmosférico, isso se dá devido ao auxílio de células modificadas

para a fixação, conhecidas por heterocistos, podendo citar como exemplos os gêneros *Aphanizomenon* e *Cylindrospermopsis* (KOMÁREK, 2003).

O pH ideal para o crescimento das cianobactérias fica em torno de 7,5 a 10, abaixo de pH 5 não é favorável ao seu desenvolvimento; As taxas de crescimento máximas são observadas em temperaturas acima de 25° e apresentam menor crescimento em temperaturas mais baixas em relação às demais algas (FERNANDES *et al.* 2009, SPERLING e JARDIM 2009).

Em todo mundo, mais de 2000 espécies já foram identificadas segundo Guven e Howard (2011), estando presentes em todos os ecossistemas aquáticos, sendo capazes de sobreviver em ambientes extremamente desfavoráveis às outras espécies. Não há a necessidade de muita luz para manter a estrutura e funções celulares no caso da cianobactérias, isso se dá devido aos vacúolos que facilitam sua flutuação, permitindo assim a migração na coluna d'água. Possuem capacidade de estocar fósforo e fixar nitrogênio, possibilitando assim seu crescimento mesmo em situações com baixa concentração de nutrientes. Devido a sua má palatabilidade é pouco predada por zooplânctons, estas características trazem vantagens competitivas em relação a outros grupos de algas (SPERLING e JARDIM, 2009).

As cianobactérias e suas florações vêm sendo estudadas há algum tempo, com o propósito de entender seu comportamento. As florações de cianobactérias ocorrem após longos períodos de seca associados a dias com muito sol e abundância de nutrientes. Paerl e Huisman (2008), afirma que altas temperaturas, nutrientes em excesso, estratificação térmica e alto tempo de residência são favoráveis à sua dominância nos ecossistemas aquáticos.

Carvalho *et al.* (2011), realizaram um estudo em 134 lagos ingleses, com o propósito de modelagem para prever as florações de cianobactérias, eles concluíram que a cor da água foi a variável mais relevante em relação as grandes populações de cianobactérias, seguidas pela alcalinidade e tempo de retenção de água. Os autores também destacaram que altas concentrações de nutrientes associadas às condições descritas acima constituem situações de grande risco para os ecossistemas. Burford *et al.* (2007) reportam que a cobertura vegetal nas bacias hidrográficas, além das concentrações de nitrogênio e fósforo, estão diretamente relacionadas a altas densidades de cianobactérias.

Giordanino *et al.* (2011) realizou experimentos com quatro espécies de cianobactérias, obtendo diferentes resultados nas espécies para as variações de radiação solar e temperatura, concluindo que nem todas as espécies respondem da mesma maneira em relação à temperatura da água. Carmichael (2001) e Guven e Howard (2011), afirmam que o principal fator para o aumento de floração de cianobactérias são as mudanças climáticas e eutrofização.

A associação entre a ocorrência de florações tóxicas e fatores ambientais é um tema muito recorrente na bibliografia. De acordo com Christiansen *et al.* (2008), os mecanismos que definem cepas tóxicas e não tóxicas das cianobactérias são frequentemente imprevisíveis. Azevedo *et al.* (1994) foi o primeiro a registrar no Brasil a produção de cianotoxinas.

Davis *et al.* (2009) concluíram que a elevação da temperatura aumentou a taxa de crescimento das cianobactérias que produzem toxinas, porém as não produtoras não apresentaram aumento de crescimento. Neste trabalho a concentração de fósforo combinado com a temperatura, foi o que resultou no maior crescimento das cepas tóxicas. No entanto Joung *et al.* (2011) obteve resultados conflitantes com os de Davis *et al.* (2009), os autores observaram em estudos com cepas de *Microcystis*, relacionando fatores ambientais com a dinâmica de cepas produtoras e não produtoras de toxinas, que o crescimento delas estão estreitamente relacionados. As cianobactérias com potencial tóxico podem apresentar cepas não produtoras e produtoras de cianotoxinas em um mesmo momento, os fatores que levam a estas variações ainda não são conhecidos, e a proporção da densidade entre estes fatores podem variar.

Florações de cianobactérias são causadas por diversas alterações das condições naturais nos ambientes aquáticos, na maioria das vezes estas mudanças estão relacionadas com o excesso de nutrientes e altas temperaturas. Estes fatores podem resultar em um crescimento descontrolado das comunidades de cianobactérias, fenômeno conhecido como floração, conforme descrito por Bittencourt-Oliveira e Molica (2003), no qual os autores observaram que as florações podem alterar o equilíbrio dos ecossistemas aquáticos e conferir odor e sabor à água, porém o maior problema relacionado às florações de cianobactérias é a produção de cianotoxinas, prejudiciais à saúde humana e de outros animais.

Um dos problemas acarretados pelas cianobactérias é o *off-flavor* (gosto de barro) em peixes, ele pode ser causado por metabólitos secundários

produzidos por cianobactérias existentes nas áreas de cultivos. O composto responsável por este problema frequentemente é a geosmina, que ocorre devido às altas densidades populacionais de cianobactérias e actinomicetos (REBOUÇAS *et al.*, 2017).

Segundo Mottram (1998), o *off-flavor* é caracterizado por qualquer sabor que não seja normal ao alimento. O aumento de oferta da ração oferecido para os peixes pode ter relação com o *off-flavor* (BROWN e BOYD, 1982), a ração em excesso causa acúmulo de nutrientes tornando o ambiente eutrófico, favorecendo o desenvolvimento das cianobactérias. Para Tucker (1999), a alimentação, o desequilíbrio ambiental e manejo no cultivo estão diretamente relacionados às alterações da comunidade fitoplanctônica que pode afetar o sabor do pescado.

Na piscicultura, os criadores enfrentam problemas com *off-flavor*, sendo que a alteração no sabor causada pela geosmina pode tornar o pescado inaceitável para o consumidor, trazendo prejuízos ao produtor. Quando ingerida ou absorvida pelos peixes, a geosmina faz com que apresentem o gosto de barro e em determinados casos a contaminação é tão drástica que torna inviável a sua comercialização (LOVELL e SACKKEY, 1973). Ainda não foram identificadas estratégias eficazes para evitar a ocorrência de *off-flavor* causado por geosmina nos peixes. No entanto, os produtores nos Estados Unidos adotam algumas práticas, dentre elas a avaliação sensorial, o controle de população de algas cianofíceas com o uso de Aagicidas à base de cobre e despesca imediata nos viveiros após avaliação sensorial detectar *off-flavor* (KUBITIZA, 2004).

Casos mais relevantes de florações afetando a aquicultura estão relacionados às cianobactérias. Existem vários registros de animais de grande e pequeno porte que foram a óbito por envenenamento por ingestão ou contato com florações tóxicas (FALCONER 1999). Um caso grave e de muita preocupação pela ação de cianotoxinas sobre humanos foi registrado em Caruaru, Pernambuco. Durante o tratamento as máquinas de hemodiálise utilizaram água contaminada por microcistinas, levando à morte de 52 pacientes com sintomas de hepato-toxicose (JOCHIMSEN *et al.*, 1998; AZEVEDO *et al.*, 2002).

As florações de cianobactérias resultam em mudanças bruscas na turbidez e coloração das águas, fenômeno este observado devido à presença de uma nata de coloração verde escura sobre a superfície da água. A abaixo (figura

1) é uma imagem registrada em uma das pisciculturas do trabalho, em um dia de coleta de amostras.



Figura 1: (Fonte própria) Aspecto típico de floração de cianobactérias, com formação de nata ou espuma verde intensa sobre a superfície da água.

1.3 Pigmentos

A presença de pigmentos específicos nas cianobactérias abre a possibilidade de detecção precoce destes microorganismos, com amplas possibilidades de aplicação na aquicultura. A composição de pigmentos num sistema aquático pode ser útil para descrever a comunidade fitoplanctônica instalada, pois cada pigmento tem um espectro específico de absorção de luz e muitos ocorrem exclusivamente em determinados grupos taxonômicos do fitoplâncton.

Estima-se que existam cerca de 100 pigmentos identificados, que foram divididos em três categorias: clorofilas, carotenóides e ficobiliproteínas (também chamados de ficobilinas) (RICHARDSON, 1996). Através da fotossíntese, a

absorção de radiação eletromagnética pelas populações de fitoplâncton possibilita a fixação de carbono e a produção de oxigênio. É a presença de pigmentos fotossinteticamente ativos que torna este processo possível, estas moléculas captam energia eletromagnética no intervalo de 400 a 700 nm (KIRK, 1994). O principal pigmento responsável pela absorção de energia eletromagnética é a clorofila (KIRK, 1994; RICHARDSON, 1996). A distribuição de clorofilas entre diferentes grupos de organismos está resumida na Tabela 1.

Tabela 1: Distribuição dos pigmentos mais comuns nos diferentes grupos de organismos do fitoplâncton.

	Clorofilas	Carotenóides além do β -caroteno	Ficobilinas	Cor predominante
Cyanophyta	a	Flavicina, Zeaxantina, Oxilaxantina, Myxoxantofila	aloficocianina, ficocianina, ficoeritrina	verde-azul
Prochlorophyta	a, b	-	-	verde
Rhodophyta	a, d	α -caroteno	aloficocianina, ficocianina, ficoeritrina	vermelha
Fucophyceae	a, c,	Luteína	-	marrom
Bacillariophyceae	a, c,	Fucoxantina	-	sourada
Dinophyta	a, c,	Peridinina	-	marrom
Chlorophyta	a, b	Luteína, Sifonoxantina	-	verde
Euglenophyta	a, b	Sifonoxantina	-	verde
Plantas terrestres	a, b	-	-	verde

Fonte: Adaptado de (Oliveira, 2003 e Richardson, 1996)

O número de carotenóides é muito maior em relação às clorofilas, sendo que todos eles têm função primária de foto-proteção. Todos apresentam forte absorção de energia na mesma região do espectro (RICHARDSON, 1996). Os pigmentos lipossolúveis são formados pelas clorofilas e carotenóides e os hidrossolúveis pela ficobiliproteínas. Os pigmentos encontrados podem ter utilidade taxonômica para determinação da presença e densidade de cianobactérias nos ambientes aquáticos (KUTSER *et al.*, 2006).

Os diferentes pigmentos presentes em uma amostra de água influenciam no comportamento espectral, estabelecendo padrões específicos de absorção e refletância (RICHARDSON, 1996). A quantidade de métodos para identificação de pigmentos vem sendo aumentada cada dia mais nos últimos anos, isso se deu principalmente devido ao avanço de técnicas modernas, como o CLEA (sigla em português para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência). O CLAE resulta em

quantificações de pigmentos lipossolúveis ou hidrossolúveis, dependendo do procedimento utilizado (GREISBERGER e TEUBNER, 2007). É possível determinar a composição do fitoplâncton através de CLAE (BARLOW *et al.*, 2007; WRIGHT *et al.*, 2010; SCHLUTER *et al.*, 2011).

1.4 Aquicultura em tanques redes

Diversos fatores qualificam o Brasil como favorável a aquicultura. O país apresenta um grande potencial hídrico, mercado interno forte, clima favorável, áreas com boas disponibilidades para instalações de pisciculturas e grande produção de matéria prima para produção de rações. O uso em larga escala do sistema de tanques-rede iniciou há mais de cinco décadas na Ásia, no delta do rio Mekong, (BEVERIDGE , 1984; MEDEIROS, 2002). No Brasil, a técnica começou a ser utilizada em meados dos anos 1990, principalmente na região Sudeste (BRANDÃO *et al.*, 2004; MEDEIROS 2002; ONO, 1998).

A partir da década de 70, a aquicultura mundial vem apresentando crescimento superior a da pesca extrativista, segundo dados da FAO (2016). No Brasil alguns programas governamentais como PRONAF (Programa de Fortalecimento da Agricultura Familiar) e FEAP (Fundo de Expansão do Agronegócio Paulista e Marketing) contribuíram para o aumento do setor (MPA, 2009). Como consequência do desenvolvimento da aquicultura brasileira, muitos estudos vêm sendo feitos para avaliar os impactos causados pelo sistema de aquicultura em tanques rede (exs: MALASSEN *et al.*, 2008; MACEDO e SIPAUBA-TAVARES 2010). Estes estudos vêm mostrando uma série de efeitos sobre diversos tipos de organismos aquáticos, podendo afetar diretamente a qualidade da água.

A quantidade significativa de resíduos orgânicos que são lançados no ambiente aquático é uma das mais marcantes características das pisciculturas de tanque redes (VITA, *et al.*, 2004). A eutrofização da água resulta no aumento da produtividade primária, com reflexos em todos os compartimentos do ecossistema (TACON e FORSTER, 2003). Os restos de ração e excretas fisiológicos são fontes de nutrientes que podem levar à eutrofização, porém os impactos

dependem de fatores como: técnicas de cultivo; qualidade da ração; espécie de peixe e práticas de manejo (WU, 1995; PILLAY, 2004)

A qualidade da água é comprometida pela decomposição destes detritos, através da oxidação feita por microrganismos, podendo levar a mortalidade das espécies ali existentes e comprometendo o uso desses recursos hídricos (SIPAÚBA-TAVARES, 1995; MEDEIROS, 2002; WU, 1995; PILLAY, 2004.). O acúmulo de matéria orgânica e nutrientes derivados destes detritos influencia diretamente na densidade de fitoplâncton a turbidez da água (ROTTA e DE QUEIROZ, 2003).

A eutrofização é favorecida pelos incrementos de matéria orgânica, podendo comprometer o sistema de cultivo, devido à redução da concentração de oxigênio dissolvido e do aumento de nutrientes, isto pode acarretar em floração de algas e cianobactérias, ocasionando prejuízos ao produtor (AMÉRICO *et al.*, 2013). O surgimento de cianobactérias pode ocasionar problemas não apenas para os produtores de peixes, mais também para gestão de águas interiores visando múltiplos usos, tais como a pesca; abastecimento de água e recreação, impactando assim na economia e saúde pública (BARTRAM *et al.*, 1999).

2. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar os impactos causados pelas pisciculturas em tanques rede sobre a comunidade fitoplanctônica.

2.1 Objetivos específicos

- Comparar os teores de pigmentos no interior das fazendas com pontos situados à montante e à jusante.
- Comparar as densidades dos diferentes grupos fitoplanctônicos no interior das fazendas com pontos situados à montante e à jusante.
- Comparar as médias das variáveis limnológicas entre as diferentes bacias estudadas.

3. Material e métodos

Nesta seção constam os detalhes metodológicos que não puderam ser inseridos no manuscrito que segue no capítulo 2, esta opção foi feita para evitar redundância de informações entre a introdução geral e o manuscrito. No manuscrito constam os detalhamentos metodológicos da coleta de dados ambientais, das quantificações de pigmentos, das análises microscópicas de fitoplâncton e análises estatísticas. Na presente seção são apresentados os métodos de cultivo de cianobactérias, que servem como base para as interpretações dos resultados das análises em CLAE.

3.1 Locais de coleta

As amostras foram coletadas em Outubro de 2016 em 6 pisciculturas de criação de Tilápia do Nilo, em seis diferentes fazendas localizadas nos principais pólos produtores do estado de São Paulo. A tabela 2 relaciona as bacias hidrográficas e reservatórios onde estão situadas as pisciculturas.

Tabela 2: Identificação e localização das pisciculturas estudadas neste projeto.

IDENTIFICAÇÃO	RESERVATÓRIO	BACIA HIDROGRÁFICA
1	Chavantes	Paranapanema
2	Nova Avanhandava	Tietê
3	Nova Avanhandava	Tietê
4	Nova Avanhandava	Tietê
5	Ilha Solteira	Paraná
6	Ilha Solteira	Grande

As pisciculturas estão localizadas conforme mapa indicado na figura 2.

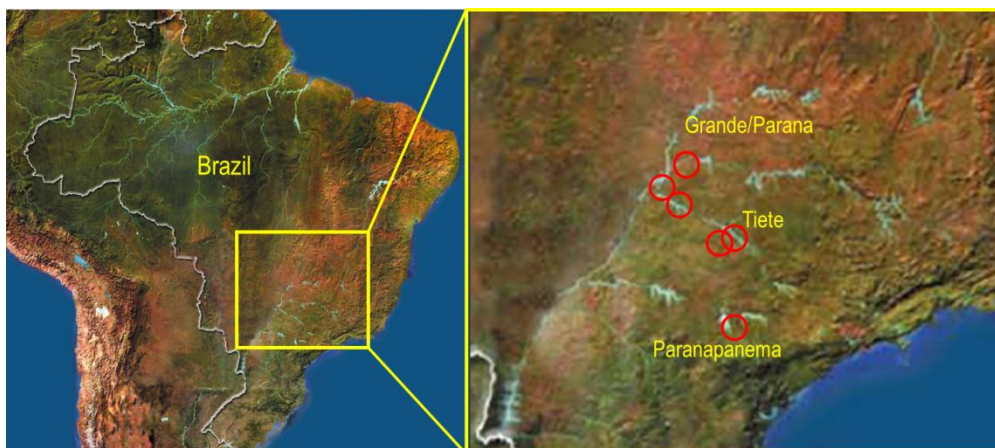


Figura 2: Mapa dos reservatórios avaliados durante o presente estudo.

A figura 3 ilustra a disposição das estruturas de cultivos nas diferentes fazendas analisadas neste estudo.



Figura 3:(Fonte própria) Exemplos da disposição das estruturas de cultivo nas diferentes fazendas analisadas neste estudo.

Os pontos de coleta das amostras foram determinados da seguinte forma: montante, que é a localização antes dos tanques das pisciculturas, fazenda que é localização em que os tanques redes estão alojados e à jusante que é localização após as áreas dos tanques, para onde se dirige a correnteza das águas (Tabela 3). A avaliação dos impactos das pisciculturas foi feita através da comparação das variáveis mensuradas nos pontos à montante, no interior das fazendas e à jusante.

Tabela 3: Pontos efetivamente amostrados no presente estudo.

Piscicultura	Fazenda	Jusante	Montante
1	X	X	X
2	X	X	X
3	X		X
4	X	X	
5	X	X	X
6	X	X	X

Para as fazendas 1, 2, 5 e 6 foram amostrados os pontos à montante, dentro das fazendas e à jusante; As fazendas 3 e 4 estão localizadas no mesmo braço do reservatório de Nova Avanhandava, estando a fazenda 2 à montante da fazenda 3. Com isso foi amostrado apenas um ponto à montante e um ponto à jusante das duas fazendas (Tabela 3).

3.2 Cultivo de Cianobactérias

O cultivo de cianobactérias foi realizado no laboratório de microbiologia do setor de Agronomia da FIB (Faculdades Integradas de Bauru), localizada em Bauru/SP. O meio de cultivo utilizado foi o BG-11, todo o processo de formulação foi feito em laboratório, sendo feito o meio concentrado para posterior diluição do meio para uso imediato.

Para a confecção do meio de cultura concentrado foi utilizado o BG-11 sólido e líquido com o uso de cicloheximida, seguindo os procedimentos descritos para o cultivo de cianobactérias em (JACINAVICIUS *et al.*, 2013). Os meios foram preparados em três etapas:

1. Preparo de 500 ml das soluções estoque que compõem o meio concentrado, suficientes para os experimentos a serem realizados em um período de 6 meses, permanecendo armazenada em frascos plásticos e congelado até o uso. A composição de nutrientes e quantidades está descrita na tabela 4 e na tabela 5 a relação para formulação dos metais traço.

Os compostos dos metais-traços foram diluídos em 500 ml de água deionizada e a solução armazenada em frascos plásticos no freezer até o uso.

2. A partir da solução estoque foi preparado o meio concentrado. Inicialmente foram preparados 3 litros de meio de cultura concentrado. Foram usados para o procedimento do meio concentrado: 30 ml da solução de EDTA; 30 ml da solução de citrato férrico amoniacal; 3 ml da solução de metais traços; 30 ml da solução de NaNO_3 ; 30 ml da solução de $\text{K}_2\text{HPO}_4 + 3\text{H}_2\text{O}$; 30 ml da solução de $\text{MgSO}_4 + 7\text{H}_2\text{O}$; 30 ml da solução de $\text{CaCl}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$; 30 ml da solução de Na_2CO_3 e 30 ml da solução de Ácido Cítrico. Todas as soluções foram adicionadas na sequência descrita acima, principalmente os dois primeiros, pois do contrário ocorre precipitação, a solução foi misturada num frasco com o auxílio de um agitador magnético, o pH foi ajustado a 7,4. Após o preparo foi dividido em três frasco da solução e mantido congelado até o uso.

3. A última etapa, é o preparo do meio de cultura para o uso imediato. O volume de 81 ml do meio de cultura concentrado com foi descongelado e diluído em um litro de água deionizada.

Tabela 4: Composição e quantidade das soluções estoques para o preparo do meio de cultura concentrado.

NUTRIENTES	QUANTIDADES (g)
EDTA (C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈)	0,050
Citrato férrico amoniacal (C ₆ H ₈ O ₇ x Fe 3+ + yNH ₃)	0,300
Solução de metais traços	*
Nitrato de Sódio (NaNO ₃)	75,000
Fosfato ácido dipotássio trihidratado (K ₂ HPO ₄ + 3H ₂ O)	02,000
Sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO ₄ + 7H ₂ O)	3,7500
Cloreto de cálcio dihidratado (CaCl ₂ + 2H ₂ O)	1,800
Carbonato de sódio (Na ₂ CO ₃)	1,000
Ácido cítrico (C ₆ H ₈ O ₇ + H ₂ O)	0,300

Fonte: Adaptado de (JACINAVICIUS *et al.*, 2013).

Tabela 5: Composição de metais traços (*).

NUTRIENTES	QUANTIDADES (g)
H ₃ BO ₃	1,430
MnCl ₂ + 4H ₂ O	0,905
ZnSO ₄ + 7H ₂ O	0,111
NaMoO ₄	0,185
CuSO ₄ + 5H ₂ O	0,040
Co(NO ₃) ₂ + 6H ₂ O	0,025

Fonte: Adaptado de (JACINAVICIUS *et al.*, 2013).

Para a confecção do meio sólido foi adicionado um litro de água deionizada com 10 g de ágar, em seguida autoclavado por trinta minutos. Depois de esfriar foi adicionado 0,05 gramas de ciclohexamida por litro de meio de cultura (necessário para não ocorrer contaminação), sempre abaixo da temperatura máxima de 50°C para que não seja afetada a eficácia da ciclohexamida. As placas de Petri foram preenchidas com 30 ml de meio de cultura, sendo todo o procedimento realizado dentro da capela estéril de fluxo laminar.

Para a confecção do meio líquido foi adicionado a um litro de água deionizada ao meio de cultura concentrado, em seguida autoclavado por 30 minutos, quando já frio foi adicionado 0,05 grama por litro de ciclohexamida. Os tubos de ensaio foram preenchidos com 17 ml do meio pronto, todo procedimento foi realizado dentro da capela estéril de fluxo laminar.

O processo de inoculação foi feito em câmara de fluxo laminar onde foram espalhadas uniformemente três gotas do material sobre o meio de cultura sólido, após as amostras serem homogeneizadas com o auxílio de uma alça de Drigalski já flambada no bico de Bunsen. Depois de inoculadas, as placas foram datadas, identificadas, seladas com parafilme e colocadas na câmara de cultivo (BOD), com a parte que se encontra o meio voltado para cima, para que não acumulasse água na tampa, não ocasionando assim contaminação. A temperatura ficou em 25°C, com fotoperíodo de 24 horas.

Após três semanas algumas colônias já estavam estabelecidas no meio de cultura, através de exame visual como forma, cor e texturas estas colônias foram passadas para o meio líquido com a ajuda de uma alça metálica, porém as placas foram mantidas, pois algumas cianobactérias apresentam crescimento mais lento, demorando cinco semanas para serem transferidas para o meio líquido.

Os tubos de ensaio com o meio líquido já inoculado permaneceu na BOD (“Biochemical Oxygen Demand” em inglês, em português é denominada câmara de cultivo) por 30 dias, depois deste período uma nova seleção do material foi feita por meio visual, retirando uma pequena porção e colocada em outro tubo com meio líquido, este processo foi repetido por três vezes. Após este processo as amostras foram analisadas em microscópio e separadas, destas amostras analisadas cinco foram selecionadas e colocadas em frasco de Erlenmeyer contendo 500 ml de meio líquido, com oxigenação contínua durante 15 dias, conforme o crescimento destas, uma pequena parte foi retirada e inoculada em um novo meio de cultura, com de 700 ml, este processo se deu por mais três vezes para a purificação da cepa. Estas amostras foram enviadas para o Instituto de Botânica para identificação. Todo meio de cultura utilizado foi preparado no dia da transferência de inóculo para um meio novo.

A figura 4 ilustra as etapas do desenvolvimento do trabalho, que consistiu em (a) inoculação da amostra de água em meio nutritivo líquido, (b) placas de Petri com amostras em meio sólido e tubos de ensaio com amostras em meio líquido, (c) identificação em microscópio da espécie *Chroococcus* cf, (d) etapa de purificação das cepas.

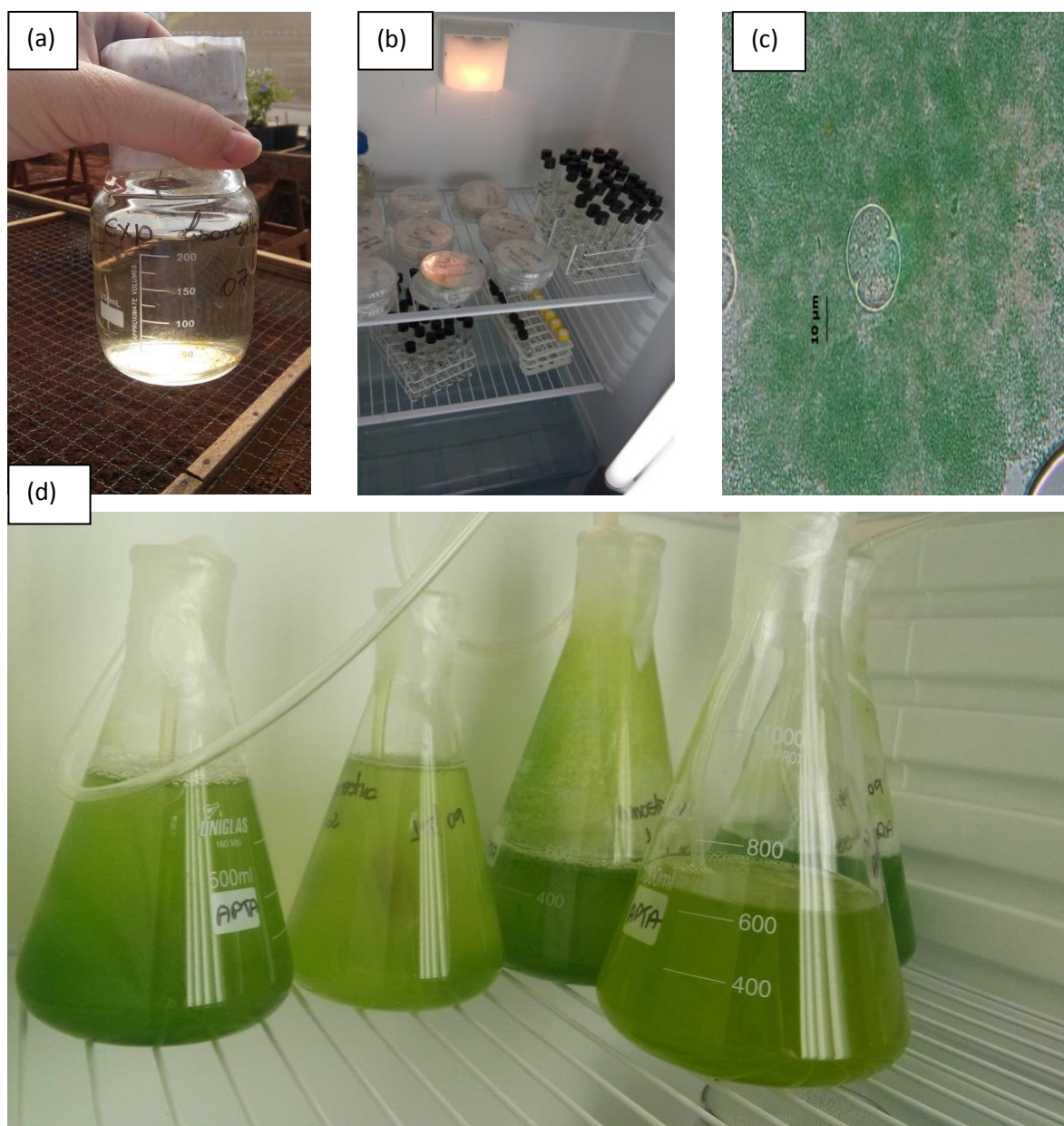


Figura 4: Sequencia das etapas do cultivo de cianobactérias: (a) inoculação da amostra de água em meio nutritivo líquido, (b) placas de Petri com amostras em meio sólido e tubos de ensaio com amostras em meio líquido, (c) identificação em microscópio da espécie *Chroococcus* cf, (d) etapa de purificação das cepas.

Referências

- AMÉRICO, J. H. P.; TORRES, N. H.; MACHADO, A. A.; DE CARVALHO, S. L. Piscicultura em tanques-rede: impactos e consequências na qualidade da água. *Revista Científica ANAP Brasil*, 6 (7), 2013.
- AZEVEDO, S. M. F. O.; CARMICHAEL, W. W.; JOCHIMSEN, E. M.; RINEHART, K. L.; LAU, S.; SHAW, G. R. S.; EAGLESHAM, G. K. Human intoxication by microcystis during renal dialysis treatment in Caruaru – Brazil. *Toxicology*, 181 - 182, 441-446, 2002.
- AZEVEDO, S. M. F. O.; EVANS, W. R.; CARMICHAEL, W. W.; NAMIKOSHI, M. First report of microcystins from a Brazilian isolate of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Applied Phycology*, v.6, n.3, p. 261-265, 1994.
- BARLOW, R.; STUART, V.; LUTZ, V.; SESSIONS, H.; SATHYENDRANATH, S.; PLATT, T.; *et al.* Seasonal pigment patterns of surface phytoplankton in the subtropical southern hemisphere. *Deep-Sea Research I: Oceanographic Research Papers*, v. 54, n. 10, p. 1687-1703, 2007.
- BARTRAM, J.; CARMICHAEL, W. W.; CHORUS, I.; JONES, G.; SKULBERG, M. Introduction. In: CHORUS, I.; BARTRAM, J. (Org.). *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring, and Management*. Londres: E & FN Spon, p. 12- 24, 1999.
- BEVERIDGE, MALCOLM C. M. Cage and pen fish farming: carrying capacity models and environmental impact. *FAO (Food & Agriculture Org.)*, 1984.
- BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C.; MOLICA, R. Cianobactéria invasora – Aspectos moleculares e toxicológicos de *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*. ano VI, n.30, p.82-90, 2003.
- BRANDÃO, F. R.; GOMES, L. C.; CHAGAS, E. C.; ARAÚJO, L. D. Densidade de estocagem de juvenis de tambaqui durante a recria em tanques-rede. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.39, n.4, p.357-362, 2004.

- BROW, S. W.; BOYD, C. E. Off-flavor in channel catfish from commercial ponds Transactions of the *American Fisheries Society*, v.111, p.379-83, 1982.
- BURFORD, M. A.; JOHNSON S. A.; COOK A, J.; PACKER, T. V.; TAYLOR, B. M.; TOWNSLEY E. R. Correlations between watershed and reservoir characteristics, and algal blooms in subtropical reservoirs. *Water Research*, v. 41, n. 18, p.4105-4114, 2007.
- CARMICHAEL, W. W., Health effects of Toxin-Producing Cyanobacteria: "The CyanoHABs". *Human and Ecological Risk Assessment*, v. 7, n. 5, p. 1393-1407, 2001.
- CARMICHAEL, W. W. *The toxins of cyanobacteria. Scientific American*, v. 270, n. 1, p. 78-86, 1994.
- CARVALHO, L.; MILLER, C. A.; SCOTT, M. E.; CODD, G .A.; DAVIES, P. S.; TYLER, A. N. Cyanobacterial blooms: Statistical models describing risk factors for national-scale lake assessment and lake management. *Science of The Total Environment*, v. 409, n. 24, p. 5353-5358, 2011.
- CHRISTIANSEN, G.; MOLITOR, C.; PHILMUS, B.; KURMAYER, R. Nontoxic Strains of Cyanobacteria Are the Result of Major Gene Deletion Events Induced by a Transposable Element. *Mol. Biol. Evol.*, v.25, n.8, p. 1695-1704, 2008.
- DAVIS, T. W.; BERRY, D. L.; BOYER, G. L.; GOBLER, C. J. The effects of temperature and nutrients on the growth and dynamics of toxic and non-toxic strains of *Microcystis* during cyanobacteria blooms. *Harmful Algae*, v.8, p. 715-725, 2009.
- ESTEVEZ, F. A. *Fundamentos de limnologia*. 3. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2011.
- FALCONER I. R. An overview of problem caused by toxic blue-green algae (Cyanobacteria) in drinking and recreational water. *Environ Toxicology*. v. 14, n. 1, p. 5-12, 1999.
- FAO. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2016*. Disponível em:

<http://www.fao.org/3/a-i5555e.pdf>. Acesso em: 29 Março. 2018.

- FERNANDES, V. O.; CAVATI, B.; OLIVEIRA, L. B.; SOUZA, B. D. Ecologia de cianobactérias: fatores promotores e consequências das florações. *Oecologia Brasiliensis*, v.13, p. 247-258, 2009.
- GIORDANINO, M. V. F.; STRAUCH, S. M.; VILLAFÁÑE, V. E.; HELBLING, E. W. Influence of temperature and UVR on photosynthesis and morphology of four species of cyanobacteria. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 103, n. 1, p. 68-77, 2011.
- GREISBERGER, S.; TEUBNER, K. Does pigment composition reflect phytoplankton community structure in differing temperature and light conditions in a deep alpine lake? An approach using HPLC and delayed fluorescence techniques. *Journal of Phycology*, v. 43, n. 6, p. 1108-1119, 2007.
- GUVEN, B. e HOWARD, A. Sensitivity analysis of a cyanobacteria growth and movement model under two different flow regimes. *Environmental Modeling and Assessment*, v. 16, n.6, p. 577-589, 2011.
- HUPPERT, A.; OLINKY, R.; e STONE, L. Bottom-Up Exitable Models of Phytoplankton Blooms. *Bulletin of Mathematical Biology*. v. 66, n. 4, p. 865-878, 2004.
- JACINAVICIUS, F. R.; GAMA JUNIOR, W. A.; AZEVEDO, M. T. P.; SANTANNA, C. Manual para cultivo de cianobactérias. São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente, 2013.
- JOCHIMSEN, E. M; CARMICHAEL W. W.; JOCHIMSEN, E. M.; CARMICHAEL W. W.; J. S. AN, J.; CARDO D. M.; COOKSON S. T.; HOLMES C. E.; ANTUNES M. B.; MELO FILHO D. A.; LYRA T. M.; BARRETO V. S.; AZEVEDO S. M.; JARVIS W. R. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis 567 Center in Brazil. *The New England Journal of Medicine*. v. 338, n. 13, p873-878, 1998.
- JOUNG, S. H.; OH, H. M.; KO, S. R.; AHN, C. Y. Correlations between vironmental factors and toxic and non-toxic Microcystis dynamics during bloom in Daechung Reservoir, *Korea Harmful Algae*, v.10, p.188-193, 2011.

- KIRK, J. T. Light and photosynthesis in aquatic ecosystems. *Cambridge University Press*, 1994.
- KOMÁREK, J. "Cocoid and colonial cyanobacteria." *Freshwater Algae of North America. Ecology and Classification. Academic Press, New York, NY* (2003): 59-116.
- KUBITIZA, F. Off-flavor nos peixes cultivados. *Revista panorama da aquicultura* p. 84, 2004.
- KUTSER, T.; METSAMAA, L.; STROMBECK, N.; VAHTMAE, E. Monitoring cyanobacteria blooms by satellite remote sensing. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, v. 67, n. 1, p. 303-312, 2006.
- LOVELL, R. T.; SACKEY, L. A. Absorption by channel catfish of earthy-musty flavor compounds synthesized by cultures of blue-green algae. *Transactions of the American Fisheries Society*, v. 102, n. 4, p. 774-777, 1973.
- MACEDO, C. F.; e SIPAUBA-TAVARES, L. H. Eutrofização e qualidade da água na piscicultura: consequências e recomendações. *Bol. Inst. Pesca*, v. 36 (2),p. 149-163, 2010.
- MALLASEN, M.; BARROS, H. P.; e YAMASHITA, E. Y. Produção de peixes em tanques-rede e a qualidade da água. *Revista Tecnologia & Inovação Agropecuária*, v. 1(1), p. 47-51, 2008.
- MEDEIROS, F. C. Tanque-rede: mais tecnologia e lucro na piscicultura. Cuiabá: *Centro América*, 2002. 110p.
- MOTTRAM, D. S. Chemical taining of foods. *International Journal of foodScience and Technology*, v. 33, p. 19-29, 1998.
- OLIVEIRA, E.C. Introdução à Biologia Vegetal. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2003.
- ONO, E. A. *Cultivo de peixes em tanques-rede*. Rio de Janeiro: Fundação Biblioteca Nacional, p. 41, 1998.
- PAERL, H. W.; HUISMAN, J. *Blooms like it hot*. *Science*, v. 320, p. 57-58, 2008.

- PILLAY T. V. R. *Aquaculture and the environment*. 2^o ed. Oxford: *Blackwell Publishing*, p. 194, 2004.
- REBOUÇAS, L. O. S.; FIGUEIREDO, J. P. V.; MESQUITA, A. C. N.; JÚNIOR, J. S.; ASSIS, A. P. P.; CAMPÊLO, M. C. S.; SILVA, J. B. A.; LIMA, P. O. Qualidade física e sensorial da tilápia (*Oreochromis niloticus*) cultivada em ambiente de água doce e salgada. *Boletim de Indústria Animal*, 74 (2), pp.116-121. 2017.
- RICHARDSON, L. L. Remote Sensing of algal bloom dynamics; New research fuses remote sensing of aquatic ecosystems with algal accessory pigment analysis. *BioScience*, v. 46, n. 7, p. 492-501, 1996.
- ROTTA, M. A.; DE QUEIROZ, J. F. *Boas práticas de manejo (BPMs) para a produção de peixes em tanques-redes*. Embrapa Pantanal-Documentos (INFOTECA-E), 2003.
- SCHLUTER, L.; HENRIKSEN, P.; NIELSEN, T. G.; JAKOBSEN, H. H. Phytoplankton composition and biomass across the southern Indian Ocean. *Deep-Sea Research I: Oceanographic Research Papers*, v. 58, n. 5, p 546–556, 2011.
- SIPAÚBA-TAVARES, L. H. Limnologia aplicada à aquicultura. *Boletim Técnico Centro Aquicultura Unesp*, v. 1, p. 1-72, 1995.
- SPERLING, E. V. e JARDIM, F. A. Influence of climatic conditions on cyanobacteria blooms in a tropical water supply river. In: 34th WEDC conference, 2009, Addis Ababa. 34th WEDC conference. *Loughborough 2009 Proceedings Loughborough University*, 2009. v. 1: p. 832-836.
- TACON, A. G. J.; FOSTER, I. P. Aquafeeds and the environment: policy implications. *Aquaculture*, v. 226, n. 1, p. 181-189, 2003.
- TUCKER, C. S.; PLOEG, M. V. D. Managing off-flavor problems in pond-raised catfish. *Southern Regional Aquaculture Center*, p. 192-197, 1999.
- VITA, R.; MARÍN, A.; MADRID, J. A.; JIMÉNEZ-BRINQUISI, B.; CESARI, A.; MARÍNGUIRAO, L. Effects of wild fishes on waste exportation from a Mediterranean fish farm. *Marine Ecology Progress Series*, v. 277, p. 253-261, 2004.

WETZEL, R. G. *Limnología*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v. 14, p. 919, 1993.

WRIGHT, S. W.; VAN DEN ENDEN, R. L.; PEARCE, I.; DAVIDSON, A. T.; SCOTT, F. J.; & WESTWOOD, K. J. Phytoplankton community structure and stocks in the Southern Ocean (30–80°E) determined by CHEMTAX analysis of HPLC pigment signatures. *Deep-Sea Research II, Tropical Studies in Oceanography*, v. 57, n.9, p, 758–778, 2010.

WU, R. S. S. The environmental impact of marine fish culture: toward a sustainable future. *Marine Pollution Bulletin*, v. 31, n. 4, p. 159–166, 1995.

Capítulo 2

Artigo será submetido para o BOLETIM DO INSTITUTO DE PESCA, estando nas normas desta revista.

Avaliação dos impactos ambientais da aquicultura em tanques rede sobre a comunidade fitoplanctônica partir da análise de pigmentos.

Resumo

O estudo teve como objetivo avaliar os impactos do cultivo de tilápias em tanques rede sobre as populações de cianobactérias em seis fazendas. Para as análises de pigmentos foram avaliados quanto à sua eficiência dois métodos distintos: análise do perfil de pigmentos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e quantificação da densidade de cianobactérias através uso de um medidor de fluorescência *in situ* submersível. As amostras de pigmentos foram coletadas em três pontos das pisciculturas sendo montante, fazenda e jusante em diferentes reservatórios do estado de São Paulo. As análises de pigmentos apresentaram a presença de cianobactérias através do pigmento equinenona encontrada em todas as fazendas, assim como nas culturas das amostras de laboratório, em relação ao uso de medidor de fluorescência isso se repete, das seis pisciculturas estudadas em cinco ela foi encontrada. Através do resultados obtidos foi concluído que não foi detectado um padrão de aumento da concentração de pigmentos e dos diferentes grupos fitoplanctônicos no interior das fazendas, assim como não houve deterioração da qualidade da água quando comparados os pontos à montante e à jusante. As condições limnológicas entre as diferentes bacias estudadas foram significativamente diferentes, indicando graus diferentes de susceptibilidade entre as áreas de cultivo.

Palavras-chave: cianobactérias; CLAE; qualidade da água; tilápia do Nilo.

Abstract

Cage Aquaculture relies on good water quality, and proper management is needed to minimize environmental problems that affects negatively production. Cyanobacterial blooms caused by excess nutrients is a challenge for Aquaculture expansion in tropical countries, some species can emit toxins causing damage not only to animals, but also to the environment and other uses of water. The objective of this study was to evaluate the impacts of tilapia cage aquaculture on cyanobacterial populations in six farms. Two different methods were used for the pigment analysis: pigment profile analysis by high performance liquid chromatography (HPLC) and cyanobacterial density quantification using a submersible in situ fluorescence meter. The pigment samples were collected at three points of the fish farms, one upstream, one inside the farms and one downstream, in six farms located in different reservoirs in the state of São Paulo. Pigment analyzes indicated the presence of cyanobacteria through the pigment equinenone, found on all farms, as well as in cultures of samples grown in the laboratory. Regarding the use of fluorometer, of the six fish farms studied in five the cyanobacteria were detected. No pattern of increase of the pigment concentration and the different phytoplankton groups inside the farms was detected, nor was there any deterioration of the water quality when the upstream and downstream points were compared. The limnological conditions between the different basins studied were significantly different, indicating different degrees of susceptibility to eutrophication between the aquaculture areas located in different basins.

Key words: cyanobacteria; HPLC; water quality; Nile tilapia.

1. Introdução

A produção pesqueira global está estagnada desde a década de 90, não conseguindo atender a crescente demanda por peixes, com isso a aquicultura está preenchendo essa lacuna e, assim, pressionando a expansão para novas áreas (FAO 2016). No Sudeste do Brasil, a aquicultura em tanques rede surgiu como uma tecnologia viável para a produção de tilápia nos principais rios da bacia do Alto Paraná, transformados em sistemas de grandes reservatórios em cascata construídos para armazenamento de água para usinas hidroelétricas. O Brasil produziu 357 mil toneladas de tilápias em 2017, com crescimento anual de 8%; só no estado de São Paulo a produção de tilápias foi 66 mil toneladas em 2017, também registrando forte crescimento (PEIXE BR, 2018).

A qualidade da água é decisiva para sustentabilidade da aquicultura em tanques rede e a instalação desses sistemas em reservatórios eutróficos envolve riscos de prejudicar a qualidade da produção por acúmulo de substâncias relacionadas ao *off-flavor* e também por toxinas (WRIGHT *et al.*, 2010). Além disso, as práticas intensivas de aquicultura envolvem cargas de nutrientes que podem desencadear a eutrofização (BEVERIDGE, 2004). Os ecossistemas estudados aqui são corpos d'água tropicais, quentes e lênticos, considerados favoráveis ao desenvolvimento de cianobactérias (PAERL e PAUL, 2012). À medida que os reservatórios hidrelétricos envelhecem, favorece a ocorrência de florações devido a grande quantidade de nutrientes ali acumulados (MEREL *et al.*, 2013).

As cianobactérias podem formar densas florações em lagos de climas tropicais, temperados e subtropicais (WILLÉN *et al.*, 2011). Muitas espécies de cianobactérias produzem compostos tóxicos, que podem causar sérios danos aos organismos aquáticos (BRIAND *et al.*, 2003, MALBROUCK e KESTEMONT, 2006). Estudos sobre florações de cianobactérias sugerem que as mudanças climáticas, em conjunto com eutrofização, aumentam a frequência desses eventos (O'NEIL *et al.*, 2012). A exposição a metabólitos de cianobactérias pode resultar em intoxicação (LEVESQUE *et al.*, 2012) e acumulação de compostos de *off-flavor* nos peixes (SMITH *et al.*, 2008). As florações não são facilmente previsíveis e altamente variáveis no espaço e no tempo (RICHARDSON, 1996), fazendo com que a detecção precoce da formação de florações de cianobactérias seja um tópico relevante. Devido ao uso intensivo dos rios e lagos para a produção pesqueira, é necessário o uso de métodos analíticos para monitorar a composição das florações das algas e para prevenir o risco de cianobactérias tóxicas.

A avaliação da composição das comunidades fitoplanctônicas é tradicionalmente feita por microscopia em câmara de sedimentação, um processo lento, que envolve necessidade de mão de obra especificamente treinada na taxonomia dos grupos planctônicos. Este processo leva vários dias e até semanas, fazendo com que as análises sejam úteis apenas para a compreensão *a posteriori* dos processos de degradação da qualidade da água. O monitoramento em escala de tempo reduzida poderia ajudar a resolver esses problemas, empregando técnicas baseadas em caracteres específicos dos pigmentos de cianobactérias e algas, tais como CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (SCHLUTTER *et al.*, 2014) e em sondas de fluorescência em tempo real empregadas para avaliações *in vivo* de populações de cianobactérias auxiliam neste propósito (ZAMYADI *et al.*, 2016). Estas técnicas atendem à necessidade de ferramentas que permitam avaliações efetivas, rápidas e baratas que possam viabilizar o melhor gerenciamento ambiental dos empreendimentos aquícolas.

A análise de pigmentos é rápida, muito sensível e objetiva para a determinação da composição do fitoplâncton e estimativa da biomassa dos diferentes grupos de algas e cianobactérias. Mais de 70 pigmentos de algas já podem ser determinados em uma mesma análise de cromatografia líquida de alta eficiência, isso só foi possível pelo constante melhoramento dos métodos de análise de pigmentos (SANZ *et al.*, 2015). Os pigmentos fitoplanctônicos apresentam propriedades químicas muito diversas, abrangendo uma ampla gama de polaridades e outras propriedades moleculares que viabilizam sua diferenciação e quantificação em CLAE (PASQUET *et al.*, 2011).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o impacto do cultivo de tilápias em tanques rede sobre as populações de cianobactérias em seis fazendas situadas em diferentes reservatórios, por métodos baseados na quantificação dos pigmentos dos diversos grupos fitoplanctônicos. Os objetivos específicos foram comparar os teores de pigmentos e as densidades dos diferentes grupos fitoplanctônicos mensurados no interior das fazendas com pontos situados á montante e á jusante, assim como comparar as médias das variáveis liminológicas entre as diferentes bacias estudadas.

2. Material e Métodos

Nas análises de pigmentos foram avaliados quanto à sua eficiência dois métodos distintos: análise do perfil de pigmentos por CLAE e quantificação da densidade de cianobactérias através uso de um medidor de fluorescência *in situ* submersível.

2.1 Análises de pigmentos por CLAE:

As amostras de água foram coletadas em seis pisciculturas diferentes, com auxílio de uma garrafa de Van Dorn, coletadas em subsuperfície (um metro de profundidade) e antes das 10 horas da manhã. As amostras foram filtradas após a coleta, com volume de 1 litro em triplicata. Foram utilizados filtros de 25 mm (Whatman GF/F), utilizando bomba a vácuo ajustada aproximadamente a 25 kPa. Os filtros foram embalados em papel alumínio e imediatamente congelados em nitrogênio líquido para o transporte; em laboratório permaneceram congeladas a -18°C até a análise. As amostras foram coletadas em diferentes localizações conforme a figura 1, em pontos à montante das fazendas, no interior dos empreendimentos e à jusante.

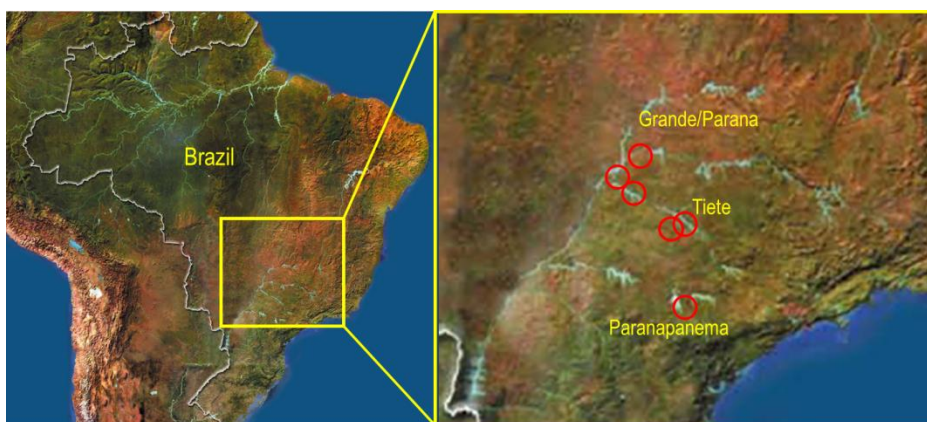


Figura 1. Mapa dos reservatórios avaliados durante o presente estudo.

As amostras cultivadas em laboratório foram filtradas com um volume de 30 ml por amostras em triplicatas, e congeladas até as análises. Os filtros contendo as amostras para o análise em CLAE foram descongelados e colocados em vials de vidro de 5 ml e cor escura, adicionado 3 ml de acetona 95% para a extração de pigmentos, as amostras foram sonicadas (em recipiente contendo gelo) por 10 minutos, após a sonicação os frascos foram envolvidos com papel alumínio, visando evitar a degradação do pigmento pela luz e mantidos a 4°C por 20 horas. Depois deste período, as amostras foram colocadas individualmente no vortex por 10 segundos, com o auxílio de seringas descartáveis o extrato foi retirado e filtrado com filtro de teflon de $0,2\ \mu\text{m}$; em seguida 1 ml foi pipetado em vial e colocados no rack do CLAE.

As amostras foram analisadas no CLAE (Shimadzu LC-20 ADXR). A coluna usada foi a ZORBAX Eclipse XDB C8, $4,6\ \text{mm} \times 150\ \text{mm}$ (Agilent Technologies). As soluções utilizadas foram as seguintes: Solvente A: solução aquosa de metanol 70% adicionada de 28 mM de ácido tributil acético (TbAA) e pH 6,4; Solvente B: 100% de

metanol. O programa utilizado foi início 0 min: 95% A, 5% B; 2 min: 95% A, 5% B; 27 min: 5% A, 95% B; 30 min: 95% A, 5% B; 31 min: 100% A, 0% B; 34 min: 100% A, 0% B; 35 min: 5% A, 95% B; 50 min: término. A taxa de fluxo foi de $1,1 \text{ mL min}^{-1}$, o volume de injeção das amostras foi de $50 \mu\text{l}$ e a temperatura das colunas de 60°C . O CLAE foi calibrado com padrões de pigmento do laboratório DHI (Danish Hydrographic Institute Dinamarca). Inicialmente, foram realizadas as curvas de calibração dos padrões externos específicos para cada pigmento, as quais foram utilizadas posteriormente na quantificação dos pigmentos presentes nas amostras analisadas no CLAE. Foram utilizados oito padrões externos sendo eles: Clorofila - a, Clorofila - b, Clorofila - c2, Equinenona, Myxoxantofila, Peridinina, Beta-caroteno e Luteína. Destes padrões externos a Equinenona e Myxoxantofila são pigmentos que apresentam diagnósticos de cianobactérias.

2.2 Cultivo de Cianobactérias:

As amostras de água foram coletadas nas pisciculturas envolvidas neste trabalho, e cultivadas no laboratório de microbiologia das Faculdades Integradas de Bauru. O cultivo foi iniciado com a inoculação em meio de cultivo BG-11 sólido até o crescimento de colônias visíveis, que posteriormente foram transferidas para o meio de cultura líquido, para identificação e purificação das cepas, todo cultivo foi realizado seguindo Jacinavicius (2013). As identificações das cepas isoladas foram feitas no Instituto de Botânica de São Paulo através de microscopia.

2.3 Medições Limnológicas e Fluorométricas *in situ*:

Uma sonda multiparâmetros YSI EXO2, equipada com medidor de fluorescência para medições de clorofila e ficocianina, além de sensores para coleta *in situ* de dados de temperatura; condutividade; oxigênio dissolvido; TDS (sólidos totais dissolvidos); pH; profundidade e turbidez. A leitura das variáveis foi feita com um metro de profundidade. Para cada área de cultivo as análises foram feitas em três pontos, denominados como fazenda, montante e jusante, em outubro de 2016. Os dados coletados pela sonda foram armazenados no próprio aparelho e transmitidos para o computador para posterior interpretação. As análises do material cultivado em laboratório com a sonda foram feitas com 500 ml de cultura pura, todos os dados foram armazenados para posterior interpretação.

2.4 Análise Estatísticas:

As análises estatísticas foram realizadas usando o Statistical Analysis Systems software package (Version 9.4; SAS Institute Inc., 2014, NC, USA). Para as análises da comunidade fitoplanctônica foi empregada a ferramenta Proc-freq para obtenção das frequências, sendo testada a probabilidade e associação das características pelo Teste qui-quadrado e Teste Exato de Fischer. As diferenças estatísticas para medidas repetidas foram avaliadas pelo One-way ANOVA. O teste de média de Duncan foi usado para avaliar os valores encontrados para as análises físico-químicas da água e para o grupo cianobactérias. O valor de P foi considerado estatisticamente significativo quando $p < 0.05$.

3. Resultados

3.1 Pigmentos por CLAE:

As análises de pigmentos das pisciculturas estudadas revelam a presença de cianobactérias detectadas pela presença de equinenona na maioria das amostras, o mixoxantofila presente em duas pisciculturas também mostra a presença de cianobactéria nestes pontos, todas as amostras apresentaram clorofila a, beta caroteno e luteína, clorofila c2 só foi encontrada em um ponto de coleta de uma piscicultura, clorofila b só na piscicultura 3 foi encontrada, o pigmento Peridininina não foi identificado em nenhuma das seis pisciculturas, como mostra a Tabela 1.

Tabela 1: Quantificação dos pigmentos encontrados nas seis pisciculturas estudadas.

Piscicultura	Local de coleta	Pigmentos $\mu\text{g/L}$							
		Clorofila a	Clorofila b	Clorofila c2	Peridininina	Equinenona	Mixoxantofila	Beta Caroteno	Luteína
1	Montante	0,15	-	-	-	0,90	-	0,34	0,98
	Fazenda	0,80	-	-	-	0,11	0,09	0,28	0,76
	Jusante	0,15	-	-	-	0,39	-	0,42	0,85
2	Montante	0,06	-	-	-	-	-	0,43	0,49
	Fazenda	0,98	-	-	-	0,11	-	0,28	0,48
	Jusante	0,19	-	-	-	0,24	-	0,88	0,49
3	Montante	0,50	0,35	1,28	-	2,90	-	6,83	0,55
	Fazenda	4,93	0,29	-	-	0,23	0,31	3,29	0,54
4	Fazenda	0,07	-	-	-	0,15	-	0,37	0,59
	Jusante	0,06	-	-	-	0,15	-	0,36	0,59
5	Montante	0,09	-	-	-	0,40	-	1,06	0,51
	Fazenda	0,08	-	-	-	0,24	-	0,70	0,54
	Jusante	0,08	-	-	-	0,24	-	1,18	0,57
6	Montante	0,10	-	-	-	0,31	-	0,84	0,51
	Fazenda	0,08	-	-	-	0,31	-	0,97	0,52
	Jusante	0,08	-	-	-	0,30	-	0,91	0,50

As análises de pigmentos das amostras cultivadas revelam a presença de cianobactérias detectadas pela presença de equinenona e mixoxantofila, presente em todas as quatro amostras, clorofila a, beta caroteno e luteína também está detectada em todas as cepas, clorofila b só foi encontrada em duas amostras coleta de uma piscicultura, os pigmentos peridinina e a clorofila c2 não foram identificados em nenhuma das amostras. Os resultados das análises de pigmentos das culturas puras estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2: Quantificação dos pigmentos encontrados nas culturas puras.

Amostras	Pigmentos µg/L							
	Clorofila a	Clorofila b	Clorofila c2	Peridinina	Equinenona	Mixoxantofila	Beta Caroteno	Luteína
1	0,27	-	-	-	0,10	2,31	0,27	1,20
2	0,61	-	-	-	0,12	3,35	0,27	1,04
3	0,48	0,17	-	-	0,13	1,98	0,29	0,96
4	1,42	0,05	-	-	0,13	4,81	0,28	0,96

Amostras: 1 = *Fragillaria sp.*, 2= *Aphanocapsa holsatica*, 3= *Phacus sp.*, 4= *Chroococcus sp.*

3.2 Cultivo de cianobactérias:

As amostras de água foram coletadas no reservatório de Nova Avanhandava, dentre as amostras cultivadas em laboratório foram purificadas e identificadas cepas de quatro espécies, sendo a amostra 1 *Fragillaria sp.*, amostra 2 *Aphanocapsa holsatica*, amostra 3 *Phacus sp.*, amostra 4 *Chroococcus cf.*

3.3 Medições limnológicas e fluorométricas *in situ*:

Na tabela 3 podemos observar os resultados dos dados ambientais encontrados nas seis pisciculturas estudadas. O reservatório de Chavantes foi o que apresentou a menor temperatura em relação aos demais, já o reservatório de Ilha solteira na fazenda 6 foi o que apresentou a mais alta temperatura registrada. A condutividade das fazendas 1 e 6 foram mais baixas em relação as fazendas situadas no rio Tiete (fazendas 2, 3 e 4), a piscicultura 5 apresenta uma condutividade alta, apesar de estar no canal de Ilha Solteira, isto ocorre provavelmente por receber água do rio Tietê através do canal de Pereira Barreto. O oxigênio apresentou valores muito altos para a piscicultura 1 localizada no Paranapanema, as demais ao redor de 6 mg/l, sendo todos os valores considerados satisfatórios para a criação de peixes. Para o pH apenas na bacia do Paranapanema foram encontrados valores abaixo de 7, nas outras fazendas todos os valores encontrados foram acima de 7. A fazenda 2 apresentou valores de pH acima de 8; turbidez, clorofila e BGA-PC em geral consideradas baixas para os todos os locais analisados.

Tabela 3: Dados ambientais encontrados nas seis pisciculturas estudadas. Ambientais foram: Temperatura; condutividade; oxigênio dissolvido; TDS; PH e turbidez.

Piscicultura	1			2			3			4			5			6			Valor p	
	Montante	Fazenda	Jusante	Montante	Fazenda	Jusante	Montante	Fazenda 1	Fazenda 2	Jusante	Montante	Fazenda	Jusante	Montante	Fazenda	Jusante				
Local Coleta																				
Temperatura ° C	20,585	20,567	20,827	24,275	24,45	23,863	23,058	23,004	22,866	23,005	23,525	24,283	24,378	24,526	24,354	24,748				
Média		20.65±0.14c			24.19±0.30a			23.03±0.38b			22.93±0.09b			24.06±0.46a			24.54±0.19a			0,0001
Condutividade µS/cm	50,6	54,2	54	141,7	138,5	143,9	151,4	149,5	154,3	149,8	226,5	123,8	118	60,8	60,6	60,9				
Média		52.93±2.02b			141.37±2.71a			150.45±1.34a			152.05±3.18a			156.10±61.03a			60.77±0.15b			0,002
Oxigenio dissolvido mg/L	12,06	11,15	11,92	5,87	7,22	6,74	5,69	6,61	6,63	6,59	6,63	6,39	6,9	6,3	6,13	5,96				
Média		11.71±0.49a			6.61±0.68b			6.18±0.65b			6.61±0.02b			6.64±0.25b			6.13±0.17b			0,0016
STD mg/L	33	35	35	92	90	94	98	97	100	97	147	80	77	39	39	40				
Média		34.33±1.15b			93.00±2.00a			97.50±0.70a			98.50±2.12a			101.33±39.57a			39.33±0.57b			0,002
pH	6,86	6,73	7,27	8,08	8,82	8,29	7,12	7,51	7,48	7,55	7,8	7,5	7,85	7,24	7,18	7,1				
Média		6.95±0.28d			8.39±0.38a			7.31±0.27bc			7.51±0.04bc			7.71±0.18b			7.17±0.07cd			0,0005
Turbidez NU	4,31	4,45	4,26	4,37	6,6	3,4	1,04	0,95	1,29	0,9	3,94	1,73	2,39	2,49	1,77	5,87				
Média		4.34±0.09a			4.79±1.64a			0.99±0.06b			1.09±0.27b			2.68±1.13ab			3.37±2.18ab			0,0437
Clorofila µg/L	0,75	0,45	0,9	2,21	2,35	1,83	2,35	2,37	1,34	2,36	3,61	1,24	0,93	0,55	0,37	0,41				
Média		0.70±0.22bc			2.13±0.26ab			2.36±0.01a			1.85±0.72ab			1.92±1.46ab			0.44±0.09c			0,0459
BGA-PC µg/L	0,01	0	0,03	0,66	1,03	0,36	0,16	0,13	0,28	0,11	0,43	0,2	0,13	0,18	0,08	0,65				
Média		0.01±0.03b			0.68±0.33a			0.14±0.02b			0.19±0.12b			0.25±0.15ab			0.30±0.08ab			0,05

STD mg/L = Sólidos totais dissolvidos

Na tabela 4 podemos observar os dados taxonômicos encontrados nas seis pisciculturas estudadas. Em relação à composição fitoplanctônica, os grupos taxonômicos Cyanophyta e as Cryptophyceae são as que apresentaram maiores abundâncias. Na piscicultura 1 não ocorreu presença significativa de cianobactérias, mas sim uma grande quantidade de Cryptophyceae. As pisciculturas instaladas na bacia do rio Tietê apresentaram maior abundância de cianobactérias, especialmente na piscicultura 3, que as pisciculturas instaladas no Paranapanema e Rio Grande; a piscicultura 5 apresenta características intermediárias provavelmente devido à mistura com águas do Tietê recebidas através do canal de Pereira Barreto.

Tabela 4: Dados taxonômicos

Piscicultura	1			2			3			4			5			6			Valor p
	Local Coleta	Montante	Fazenda	Jusante	Montante	Fazenda	Jusante	Montante	Fazenda 1	Fazenda 2	Jusante	Montante	Fazenda	Jusante	Montante	Fazenda	Jusante		
Cyanobactérias (org/ml)	0	0	0	113	79	176	4.143	1.792	2.118	709	341	629	658	71	212	59			
Média		0,00 c			122.67±49bc		2967.5±1662a		1414±997bc			542.7±175bc			114±85 bc		0,0032		
Cyanobactérias (org/ml)	0	0	0	1.26 (113)	0.88 (79)	1.96 (176)	37.32 (4143)	16.14 (1792)	19.08 (2118)	6.39 (709)	3.07 (341)	5.67 (629)	5.93 (658)	0.64 (71)	1.91 (212)	0.53 (59)			
Média (%)		0,00			4,10		53,47		25,47			14,67			3,08		0,0001		
Chlorophyceae	0	0	0	0	10.36 (72)	5.32 (37)	2.01 (14)	9.06 (63)	14.24 (99)	5.61 (39)	3.74 (26)	5.90 (41)	9.64 (67)	8.78 (61)	9.50 (66)	15.83 (110)			
Média (%)		0,00			15,68		11,08		19,86			19,28			34,10		0,0001		
Bacillariophyceae	20.97 (26)	0	0	0	4.84 (6)	14.52 (18)	33.06 (41)	12.90 (16)	0	5.65 (7)	0	0	8.06 (10)	0	0	0			
Média (%)		20,97			19,35		45,97		5,65			8,06			0,00		0,0001		
Coccinodiscophyceae	0	0	0	0	0	10.85 (28)	31.78 (82)	9.30 (24)	6.59 (17)	22.87 (59)	3.49 (9)	5.43 (14)	0	3.88 (10)	0	5.81 (15)			
Média (%)		0,00			10,85		41,09		29,46			8,91			9,69		0,0001		
Cryptophyceae	7.38 (1952)	2.90 (766)	4.22 (1117)	6.21 (1644)	4.24 (1123)	6.19 (1637)	3.62 (957)	4.13 (1093)	23.15 (6124)	3.56 (943)	5.61 (1485)	10.39 (2748)	5.84 (1544)	4.44 (1176)	3.34 (885)	4.78 (1265)			
Média (%)		14,49			16,64		7,75		26,71			21,83			12,57		0,0001		
Choanoflagellata	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
Média (%)		0,00			100,00		0,00		0,00			0,00			0,00		ns		
Chrysophyceae	17.57 (13)	0	22.97 (17)	0	16.22 (12)	12.16 (9)	0	0	0	0	12.16 (9)	0	0	0	9.46 (7)	9.46 (7)			
Média (%)		40,54			28,38		0,00		0,00			12,16			18,92		0,0001		
Dinophyceae	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
Euglenophyceae	0	0	0	0	0	0	62.79 (27)	37.21 (16)	0	0	0	0	0	0	0	0			
Média (%)		0,00			0,00		100,00		0,00			0,00			0,00		ns		
Klebsormidiophyceae	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
Trebouxiophyceae	0	0	2.08 (8)	0	0	2.34 (9)	10.68 (41)	2.40 (86)	38.80 (149)	18.75 (72)	0	0	4.95 (19)	0	0	0			
Média (%)		2,08			2,34		33,07		57,55			4,95			0,00		0,0001		
Zygnemophyceae	0	0	0	0	0	0	31.11 (14)	0	37.78 (17)	0	0	31.11 (14)	0	0	0	0			
Média (%)		0,00			0,00		31,11		37,78			31,11			0,00		0,0001		

Na tabela 5 temos os dados ambientais referentes às culturas cultivadas em laboratório. O pH de todas as amostras apresentou valores semelhantes, a turbidez teve um maior valor na amostra 3, a clorofila mg/l e a RFU foram muito maiores na amostra 4 assim como BGA teve um valor maior na amostra 4.

Tabela 5: Dados ambientais das amostras cultivadas em laboratório.

Amostra	pH	Turbidez	Clorofila RFU	Clorofila mg/l	BGA RFU	BGA mg/l
1	9,55	45,25	12,39	49,64	125,47	125,74
2	9,6	32,64	15,99	63,94	126,26	126,46
3	9,45	69,67	15,53	62,14	108,22	107,84
4	9,8	46,53	22,26	89,07	144,44	145,4

Amostras: 1 = *Fragillaria sp.*, 2= *Aphanocapsa holsatica*, 3= *Phacus sp.*, 4= *Chroococcus sp.*
BGA: Ficocianina

4. Discussão

Análises de pigmentos:

Tipicamente, o método de CLAE é considerado aplicável para determinar apenas grupos ou classes de fitoplâncton, mas em alguns casos o método tem sido usado para determinar a presença de espécies (SCHLUTER *et al.*, 2018). Por exemplo, as espécies tóxicas de cianobactérias no mar Báltico, *Nodularia spumigena*, contêm um pigmento raro e único, a 4-ceto-myxoxanthophyll, que pode ser utilizado como um pigmento de diagnóstico para o alerta precoce de florescimento desta cianobactéria no mar Báltico (SCHLUTER *et al.*, 2004).

No presente estudo, amostras de todas as pisciculturas analisadas apresentaram o pigmento equinenona, o mixoxantofila só foi encontrado em duas amostras, sendo dentro das fazendas 1 e 3, nas amostras das cepas cultivadas estes dois pigmentos foram encontrados em todas as cepas das quatro amostras analisadas, em maior quantidade devido sua concentração, estes pigmentos são encontrados em espécies de cianobactérias. A clorofila a, clorofila b e clorofila c2 mostrou a presença de diatomáceas e possivelmente de crisófitas nas pisciculturas.

A equinenona é um dos pigmentos mais importantes para a detecção de cianobactérias em água doce, pois ocorrem em todas as cianobactérias cultivadas e são universalmente detectadas em muitas outras espécies de cianobactérias (GOODWIN 1980, ROWAN 1989, ROY *et al.*, 2011). Em lagos temperados eutróficos, as cianobactérias geralmente dominam a

comunidade fitoplanctônica (WATSON *et al.*, 1997, SONDERGAARD *et al.*, 2005), e isso parece ser ainda mais pronunciado em áreas subtropicais e tropicais, onde cianobactérias formadoras de bloom podem se desenvolver com nutrientes relativamente baixas taxas de entrada e concentrações (KOSTEN *et al.*, 2012, PEARL & PAUL 2012).

Os teores elevados de equinenona e clorofila a na área da fazenda da piscicultura 3 confirma os resultados da análise microscópica, indicando a utilidade das análises em CLAE para gerenciamento dos problemas de proliferação de cianobactérias em sistemas de aquicultura. As análises de pigmentos forneceram informações adicionais sobre o risco potencial de cianobactérias tóxicas. Para o alerta precoce de cianobactérias tóxicas em reservatórios de água doce, por exemplo, utilizados para a produção aquícola, as análises de pigmentos podem fornecer resultados rápidos e confiáveis sobre a presença de cianobactérias e ajudar a prever incidentes emergentes de cianobactérias tóxicas na água.

Medições limnológicas e fluorométricas:

Em relação aos dados ambientais podemos observar que a temperatura média, condutividade e TDS na fazenda 1 apresenta valores bem abaixo das demais pisciculturas, é provável que relacionado com sua localização e maior conservação da área em que está instalada. O oxigênio dissolvido apresenta valores satisfatórios em todas as pisciculturas, a turbidez é menor em alguns casos dentro das fazendas onde os tanques redes estão instalados, a clorofila é maior nas pisciculturas 2, 3 e 4, isso já era esperado devido estarem localizadas em áreas de rios mais eutrofizados, BGA-PC (Ficocianina) na maioria das amostras mostrou que dentro da fazenda apresenta uma menor quantidade, seguindo contra os princípios de que onde ela estaria alojada apresentaria uma maior eutrofização do ambiente, e conseqüentemente teria uma maior concentração de BGA-PC.

O fato das tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) serem filtradoras de plâncton pode explicar este padrão, como existe uma grande quantidade destes animais, a filtragem destas microalgas está efetivamente positiva para a área, diminuindo assim os impactos ali já instalados. Em ambientes tropicais, vem sendo testada a utilização de peixes onívoros filtradores para o controle de florações de cianobactérias. Vários autores vêm investigando a taxa de filtração da tilápia, alimentada com cianobactérias. (p.ex DATTA e JANA 1998, TURKER *et al.*, 2003, LU *et al.*, 2007). Entretanto, são escassas as informações sobre as taxas de filtração de cianobactérias filamentosas pela tilápia do Nilo. A tilápia é capaz de se alimentar de detritos no sedimento, por possuir o hábito de ressuspender os sedimentos durante a

nidificação (DRENNER *et al.*, 1996; DRENNER *et al.*, 1998). Ao se alimentar de fitoplâncton, detritos em suspensão e zooplâncton, a tilápia do Nilo pode diminuir a biomassa de zooplâncton tanto indiretamente pelo consumo dos seus principais recursos alimentares como diretamente pelo consumo desses organismos (DIANA *et al.*, 1991, FIGUEREDO e GIANI 2005).

Em relação aos dados taxonômicos das amostras das seis pisciculturas envolvidas, foi possível observar que não existiu presença cianobactérias apenas na piscicultura um, este fator pode estar relacionado a área em que está instalada, e até mesmo a temperatura local. As pisciculturas localizadas nas regiões mais eutrofizadas, apresentam um valor bem alto e com dados semelhantes ao do BGA-PC, onde dentro das fazendas contem uma concentração menor do que na montante e jusante nas pisciculturas 2, 3 e 4, nas 5 e 6 elas apresentam um valor mais alto para as fazendas em que à montante, isso pode ser devido as espécies de cianobactérias ali existentes, apesar da tilápia ser um peixe filtrador deste gênero, existe o fator da seletividade na filtração.

A incorporação de peixes filtradores é um método importante no controle de florações de cianobactérias, sobretudo onde a quantidade de nutrientes não pode ser facilmente reduzido (LU *et al.*, 2006). A microcistina foi a toxina mais abundante na taxa de cianobactérias na dieta de peixes amostrados de dois lagos etíopes Rift Valley, Awasa e Zwai (GETACHEW, 1987). A dieta da tilápia consiste em algas verdes e cianobactérias em lagos da Geórgia na Flórida (CAILTEUX *et al.*, 1992). Sabe-se também que algum grau de comportamento alimentar oportunista existe entre espécies de tilápias (MCCONNELL, 1987). Os dados ambientais das amostras cultivadas em laboratório apresentaram altos níveis em todos os itens estudados, isso se deve a alta concentração de material existente.

5. Conclusões

- Não foi detectado um padrão de aumento da concentração de pigmentos e dos diferentes grupos fitoplanctônicos no interior das fazendas, assim como não houve deterioração da qualidade da água quando comparados os pontos à montante e à jusante.
- As condições limnológicas entre as diferentes bacias estudadas foram significativamente diferentes, indicando graus diferentes de susceptibilidade entre as áreas de cultivo.

Referências

- ANUÁRIO PEIXE BR. 2018. Disponível em: <https://www.peixebr.com.br/anuario-peixebr-2018/> Acesso em: 10 maio 2018.
- BEVERIDGE MALCOLM C.M. 2004 *Cage Aquaculture*. 3ª ed. Oxford: Blackwell Publishing, p. 368.
- BRIAND, J.F.; JACQUET S.; BERNARD, C.; HUMBERT, J.F. 2003 Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems. *Veterinary research* 34: 361-377.
- CAILTEUX, R.L.; NORDHAUS, J.J.; DOBBINS, D.A. 2002 The Suwannee bass of the Wacissa and Ochlockonee rivers, Florida. In *AMERICAN FISHERIES SOCIETY SYMPOSIUM*(pp. 343-348). American Fisheries Society.
- DATTA, S.; JANA, B.B. 1998 Control of bloom in a tropical lake: grazing efficiency of some herbivorous fishes. *Journal of Fish Biology*, 53(1), 12-24.
- DIANA, J.S.; LIN, C.K.; BHUKASWAN, T.; SIRSUWANATACH, V.; BUURMA, B.J. 1991 Data Report, Volume Two, Number three. Thailand: Cycle III of the Global Experiment. *PD/A CRSP, Oregon State University, Corvallis, Oregon*, 86p.
- DRENNER, R.W.; GALLO, K.L.; BACA, R.M.; SMITH, J.D. 1998 Synergistic effects of nutrient loading and omnivorous fish on phytoplankton biomass. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 55 (9), 2087-2096.
- DRENNER, R.W.; SMITH, J.D.; THRELKELD, S.T. 1996 Lake trophic state and the limnological effects of omnivorous fish. *Hydrobiologia*, 319: 213-223.
- FAO. *The State of World Fisheries and Aquaculture 2016* Disponível em:<http://www.fao.org/3/a-i5555e.pdf>. Acesso em: 10 de Maio. 2018.
- FIGUEREDO C.C.; GIANI, A. 2005 Ecological interactions between Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, L.) and the phytoplanktonic community of the Furnas Reservoir (Brazil). *Freshwater Biology* 50: 1391-1403.
- GETACHEW, T. 1987 A study on an herbivorous fish, *Oreochromis niloticus* L., diet and its quality in two Ethiopian Rift Valley lakes, Awasa and Zwai. *Journal of Fish Biology*, 30 (4), 439-449.
- GOODWIN, T.W. 1980 *The biochemistry of the carotenoids*, 2 ed. Vol 1: Plants. Chapman and Hall, London.

- JACINAVICIUS, F.R.; GAMA JUNIOR, W.A.; AZEVEDO, M.T.P.; SANTANNA, C. 2013 Manual para cultivo de cianobactérias. São Paulo: *Secretaria do Meio Ambiente*.
- KOSTEN, S.; HUSZAR, V.L.; BÉCARES, E.; COSTA, L. S.; DONK, E.; HANSSON, L. A.; MEESTER, L. 2012 Warmer climates boost cyanobacterial dominance in shallow lakes. *Global Change Biology*, 18 (1), 118-126.
- LÉVESQUE, D.; CATTANEO, A.; HUDON, C.; GAGNON, P. 2012 Predicting the risk of proliferation of the benthic cyanobacterium *Lyngbya wollei* in the St. Lawrence River. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 69 (10), 1585-1595.
- LU, K.; JIN, C.; DONG, S.; GU, B.; BOWEN, S. 2006 Feeding and control of blue-green algal blooms by tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Hydrobiologia*, 568: 111-120.
- MCCONNELL, R.; LOWE-MCCONNELL, R. H. 1987 *Ecological studies in tropical fish communities*. Cambridge University Press.
- MALBROUCK C.; KESTEMONT P. 2006 Effects of microcystins on fish. *Environ Toxicol Chem* 25: 72–86.
- MEREL, S.; WALKER, D.; CHICANA, R.; SNYDER, S., BAURÈS, E.; THOMAS, O. 2013 State of knowledge and concerns on cyanobacterial blooms and cyanotoxins. *Environment international*, 59, 303-327.
- O'NEIL, J.M.; DAVIS, T.W.; BURFORD, M.A.; GOBLER C.J. 2012 The rise of harmful cyanobacteria blooms: the potential roles of eutrophication and climate change. *Harmful Algae* 14: 313–334.
- PAERL, H.W.; PAUL, V.J. 2012 Climate change: links to global expansion of harmful cyanobacteria. *Water research* 46: 1349–1363.
- PASQUET, V.; MORISSET, P.; IHAMMOUINE, S.; CHEPIED, A.; AUMAILLEY, L.; BERARD, J.B.; ... LAFFERRIERE, M. 2011 Antiproliferative activity of violaxanthin isolated from bioguided fractionation of *Dunaliella tertiolecta* extracts. *Marine drugs*, 9 (5), 819-831.
- RICHARDSON, L.L. 1996 Remote sensing of algal bloom dynamics. *BioScience*, 46 (7), 492-501.
- ROY, S.; LLEWELLYN, C.A.; EGELAND, E.S.; JOHNSEN, G. 2011 *Phytoplankton pigments: characterization, chemotaxonomy and applications in oceanography*. Cambridge University Press, Cambridge.
- ROWAN, K. S. 1989 *Photosynthetic pigments of algae*. CUP Archive.

- SANZ, N.; GARCÍA- BLANCO, A.; GAVALÁS- OLEA, A.; LOURES, P.; GARRIDO, J.L. 2015 Phytoplankton pigment biomarkers: HPLC separation using a pentafluorophenyloctadecyl silica column. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(10), 1199-1209.
- SCHLUTER, L.; DAVID, G.S.; JORGENSEN, N. O.; PODDUTURI, R.; TUCCI, A.; DIAS, A. S. DA SILVA, R. J. 2018 Characterization of phytoplankton by pigment analysis and the detection of toxic cyanobacteria in reservoirs with aquaculture production. *Aquaculture Environment Interactions*, 10, 35-48.
- SCHLUTER, L.; MOHLENBERG, F.; KAAS, H. 2014 Temporal and spatial variability of phytoplankton monitored by a combination of monitoring buoys, pigment analysis and fast screening microscopy in the Fehmarn Belt Estuary. *Environmental monitoring and assessment*, 186(8), 5167-5184.
- SCHLUTER, L.; GARDE, K.; KAAS, H. 2004 Detection of the toxic cyanobacteria *Nodularia spumigena* by means of a 4-keto-myxoxanthophyll-like pigment in the Baltic Sea. *Marine Ecology Progress Series*, 275, 69-78.
- SMITH, J.L.; BOYER, G.L. e; ZIMBA, P.V. 2008 A review of cyanobacterial odorous and bioactive metabolites: impacts and management alternatives in aquaculture. *Aquaculture*, 280(1-4), 5-20.
- SONDERGAARD, M.; JEPPESEN, E.; PEDER JENSEN, J.; Lildal Amsinck, S. 2005 Water Framework Directive: ecological classification of Danish lakes. *Journal of Applied Ecology*, 42 (4), 616-629.
- TURKER, H.; EVERSOLE, A.G.; BRUNE, D.E. 2003 Filtration of green algae and cyanobacteria by Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, in the Partitioned Aquaculture System. *Aquaculture*, 215(1-4), 93-101.
- ZAMYADI, A.; CHOO, F.; NEWCOMBE, G.; STUETZ, R.; HENDERSON, R.K. 2016 A review of monitoring technologies for real-time management of cyanobacteria: recent advances and future direction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 85, 83-96.
- WATSON, S.B.; MCCAULEY, E.; DOWNING, J.A. 1997 Patterns in phytoplankton taxonomic composition across temperate lakes of differing nutrient status. *Limnology and Oceanography*, 42(3), 487-495.
- WILLÉN, E.; AHLGREN, G.; TILAHUN, G.; SPOOF, L.; NEFFLING, M.R.; MERILUOTO, J. 2011 Cyanotoxin production in seven Ethiopian Rift Valley lakes. *Inland Waters*, 1(2), 81-91.

WRIGHT, S. W.; VAN DEN ENDEN, R. L.; PEARCE, I.; DAVIDSON, A.T.; SCOTT, F.J.; WESTWOOD, K.J. 2010 Phytoplankton community structure and stocks in the Southern Ocean (30–80 E) determined by CHEMTAX analysis of HPLC pigment signatures. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 57(9-10), 758-778.